

校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620111152356

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

刃天青显色法和Dxr酶抑制剂模型对海洋真菌来源抗弧菌活性物质的高通量筛选

HTS by Resazurin Assay and Dxr inhibitors for Anti-*Vibrio* agents from Marine Fungi

李芊

指导教师姓名: 王义权 教授

陈建明 研究员

王蔚 副研究员

专业名称: 遗传学

论文提交日期: 2014 年 04 月

论文答辩时间: 2014 年 05 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2014 年 05 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

---

## 目录

摘要 .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
缩略语一览表 .....	XI
第一部分 前言 .....	1
1 弧菌病危害及流行特征 .....	1
1.1 弧菌病及感染传播途径 .....	1
1.2 弧菌形态、分类 .....	3
1.3 弧菌的致病机理 .....	3
1.4 弧菌病的治疗 .....	4
2. 高通量药物筛选技术概述 .....	5
2.1 细胞水平药物筛选模型 .....	6
2.2 分子水平筛选模型 .....	7
2.2.1 萜类及生物合成途径概述 .....	7
3 海洋真菌 .....	12
4. 本论文立题依据及研究意义 .....	15
第二部分 材料与方法 .....	16
1 实验材料 .....	16
1.1 培养基 .....	16
1.2 相关溶液的配制 .....	17
1.3 工具酶 .....	18
1.4 试剂盒 .....	18
1.5 相关试剂与药品 .....	18
1.6 主要仪器与设备 .....	19
1.7 供试海洋真菌及病原菌、质粒及菌种 .....	19

<b>2 刃天青高通量筛选抗弧菌活性化合物方法的建立.....</b>	<b>21</b>
2.1 弧菌的培养.....	21
2.2 刃天青筛选方法最适条件的确定.....	21
2.3 环丙沙星及红霉素抗弧菌的最低抑菌浓度的测定.....	21
2.3.1 刃天青法 .....	21
2.3.2 平板稀释法 .....	22
2.4 刃天青作为显示剂高通量检测海洋真菌天然馏分抗弧菌活性.....	22
2.4.1 海洋真菌初级馏分库的建立 .....	22
2.4.2 高通量筛选抗弧菌的活性馏分 .....	23
2.4.3 高通量筛选技术参数评价 .....	23
2.4.4 海洋真菌天然次级馏分的制备 .....	23
2.4.5 次级馏分的筛选及单一化合物 MIC 及 MBC 的测定.....	24
<b>3 以 Dxr 为靶点的新型抗弧菌药物分子水平模型的建立和应用 .....</b>	<b>24</b>
3.1 DNA 相关实验和方法 .....	24
3.1.1 创伤弧菌 E1758 总基因组的提取 E1758 .....	24
3.1.2 大肠杆菌感受态的制备 .....	25
3.1.3 转化 .....	25
3.1.4 小量质粒 DNA 的提取 .....	26
3.1.5 脱氧木酮糖-5 磷酸消旋酶基因克隆及测序 .....	26
3.2 His-DXR 融合蛋白诱导表达及纯化 .....	30
3.2.1 His-DXR 融合蛋白的原核表达 .....	30
3.2.2 采用 Ni-NTA 亲和层析纯化重组蛋白 .....	30
3.2.3 SDS-PAGE .....	31
3.2.4 测定蛋白浓度 .....	32
3.2.5 Ni-NTA 再生和制备 .....	32
3.3 抑制 His-DXR 酶活性次级馏分的筛选 .....	33
3.3.1 还原型辅酶 II OD 值-浓度线性标准曲线的制作 .....	33
3.3.2 1-脱氧木酮糖-5 磷酸消旋酶 (His-DXR) 的活性测定 .....	34
3.3.3 筛选模型的初步建立 .....	34

<b>第三部分 实验结果与分析</b>	<b>36</b>
<b>1 刃天青高通量筛选抗弧菌活性化合物方法的建立</b>	<b>36</b>
1.1 刃天青高通量筛选最适条件的确定	36
1.2 环丙沙星及红霉素抗弧菌的最低抑菌浓度的测定	37
1.3 刃天青作为显示剂高通量检测海洋真菌天然馏分抗弧菌活性	41
1.4 次级馏分的筛选及单一化合物 MIC 及 MBC 的测定	44
<b>2 以 Dxr 为靶点的新型抗弧菌药物分子水平模型的建立</b>	<b>46</b>
2.1 pET-22b <sup>+</sup> -dxr 表达载体的构建和鉴定	46
2.2 His-DXR 融合蛋白的诱导表达及纯化	46
2.3 His-DXR 蛋白浓度的测定	46
2.4 还原型辅酶 II OD 值-浓度线性标准曲线的制作	48
2.5 重组 His-DXR 的酶活性的测定及 NADPH 稳定性考察	48
2.6 最适酶活反应条件的测定	49
2.6.1 缓冲溶液浓度的确定	49
2.6.2 体系反应温度的确定	49
2.6.3 反应体系 pH 的确定	50
2.6.4 Mg <sup>2+</sup> 加入浓度的确定	51
2.6.5 反应体系中 DXP 加入量的确定	51
2.6.6 标准品磷胺霉素及海洋真菌次级馏分酶活抑制实验	52
<b>第四部分 讨论</b>	<b>54</b>
1 刃天青高通量筛选抗弧菌活性化合物方法的建立	54
2 以 Dxr 为靶点的新型抗弧菌药物分子水平模型的建立	56
3 本论文的创新之处	57
<b>第五部分 结论</b>	<b>58</b>
<b>参考文献</b>	<b>60</b>
<b>致谢</b>	<b>68</b>

---

## Contents

<b>Abstract in Chinese .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>XI</b>
<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1 The damages and epidemiology of vibriosis.....</b>	<b>1</b>
1.1 The infection and transmission of vibriosis .....	1
1.2 Classification of <i>vibrio</i> species .....	3
1.3 The pathogenesis of <i>vibrio</i> .....	3
1.4 The treatment of vibriosis .....	4
<b>2 High throughput screening techniques.....</b>	<b>5</b>
2.1 Drug screening at the cellular level .....	6
2.2 Drug screening at the molecular cell .....	7
2.2.1 Terpene biosynthesis pathway .....	7
<b>3 Marine fungi .....</b>	<b>12</b>
<b>4 The purpose and significance of this study .....</b>	<b>15</b>
<b>Chapter 2 Materials and methods .....</b>	<b>16</b>
<b>1 Materials.....</b>	<b>16</b>
1.1 Culture medium .....	16
1.2 Reagent formula.....	17
1.3 Instrumental enzyme .....	18
1.4 Kit .....	18
1.5 Chemicals and reagents.....	18
1.6 Main equipment .....	19
1.7 Strains and plasmids.....	19

---

<b>2 Establishment of resazurin method for high throughout screening of active compound against <i>vibrios</i></b> .....	<b>21</b>
2.1 Culture of <i>vibrios</i> .....	21
2.2 Optimization of resazurin reduction to measure <i>vibrio</i> viability .....	21
2.3 Minimum inhibitory concentration of <i>vibrio</i> to ciprofloxacin and erythromycin .....	21
2.3.1 Resazurin method .....	21
2.3.2 Agar dilution method .....	22
2.4 Resazurin evaluates the viability of <i>vibrio</i> in HTS of maine fungi natural fractions.....	22
2.4.1 The establishment of marine fungi primary fractions library .....	22
2.4.2 HTS Assay .....	23
2.4.3 Statistical analysis of HTS.....	23
2.4.4 Preparation of marine fungi sencondary fractions.....	23
<b>3 The establishment and application of anti-<i>vibrio</i> molecule-based screening model targeting to Dxr</b> .....	<b>24</b>
3.1 Experiments and methods of DNA .....	24
3.1.1 Genomic DNA Preparation of <i>Vibrio vulnificus</i> E1758 .....	24
3.1.2 Preparation of <i>E.coli</i> competent cell .....	25
3.1.3 Transifomation .....	25
3.1.4 Mini-prep of plasmid DNA .....	26
3.1.5 Cloning and sequencing the gene of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase .....	26
3.2 Expression and purification of His-DXR protein .....	30
3.2.1 Expression of the proteins .....	30
3.2.2 Purification His-DXR by Ni-NTA affinity chromatography .....	30
3.2.3 SDS-PAGE .....	31
3.2.4 Determine protein concentration .....	32
3.2.5 The regeneration and preparation of Ni-NTA .....	32
3.3 Screening of the secondary fraction inhibitors of His-DXR enzyme activity	



.....	33
3.3.1 The standard linear curve of NADPH according to OD vs concentration	33
3.3.2 Determination of His-DXR enzymic activity .....	34
3.3.3 Establishment of screening model.....	34
<b>Chapter 3 Results and analysis .....</b>	<b>36</b>
<b>1 Establishment of resazurin method for high throughout screening of active compound against <i>vibrios</i>.....</b>	<b>36</b>
1.1 Optimization of HTS to measure <i>vibrio</i> viability by resazurin.....	36
1.2 Minimum inhibitory concentration of vibrio to ciprofloxacin and erythromycin .....	37
1.3 Resazurin is a valuable indicator to determine <i>vibrio</i> viability in HTS of maine fungi natural fractions .....	41
1.4 The screening of secondary fractions and the determination of MIC and MBC for compound .....	44
<b>2 The establishment and application of anti-<i>Vibrio</i> molecule-based screening model targeting to Dxr .....</b>	<b>46</b>
2.1 Construction and identification of expression vector pET-22b <sup>+</sup> -dxr.....	46
2.2 Expression and purification of His-DXR.....	46
2.3 Determine protein His-DXR concentration .....	46
2.4 The standard linear curve of NADPH according to OD vs concentration.....	48
2.6 Determine the optimal reaction conditions of enzyme .....	49
2.6.1 The concentration of buffer solution .....	49
2.6.2 Tthe optimum temperature of system.....	49
2.6.3 The optimum pH.....	50
2.6.4 The optimum concentration of Mg <sup>2+</sup> .....	51
2.6.5 The optimum concentration of DXP .....	51
2.6.6 Inhibition studies of fosmidomycin and secondary fractions.....	52
<b>Chapter 4 Discussion.....</b>	<b>54</b>

---

1 Establishment of resazurin method for high throughout screening of active compound against <i>vibrios</i> .....	54
2 The establishment and application of anti- <i>Vibrio</i> molecule-based screening model targeting to Dxr .....	56
3 Innovation of this paper .....	57
<b>Chapter 5 Conclusion.....</b>	<b>58</b>
<b>Refrence.....</b>	<b>60</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>68</b>

## 摘要

弧菌病是水产养殖业最重要的细菌病之一，其爆发后死亡率高，给我国水产养殖业造成重大经济损失。人们为了防治水产动物弧菌病，大量盲目使用抗生素，使耐药性菌株不断出现，使病害更加难以控制，需要不断地寻找新的、安全的抗菌药物。海洋真菌因其独特生长代谢机制，具有产生大量结构新颖、活性强的化合物的潜力，成为当下国内外学者研究的热点。

本研究以筛选抗弧菌的活性化合物为目标，建立刃天青荧光高通量微量显色法，优化刃天青显色法实验条件，并对比平板稀释法，评价了刃天青方法在测定药物对弧菌最低抑菌浓度（MIC）实验中的适用可行性，并实现了对来源于 32 株海洋真菌的 916 个初级馏分的活性筛选，具有直观、可靠、灵敏、微量、经济等优点。根据筛选结果和相关文献报道挑出尖刀镰孢菌、白色侧齿霉、黄曲霉三株真菌进行重新发酵，利用正相反相柱层析、TLC、HPLC 方法分离出次级馏分，用刃天青显色方法进行活性跟踪，从白色侧齿霉发酵物中分离出对供试弧菌均有抑菌活性的新化合物 EngyodontiuminA。

萜类化合物及其衍生物是自然界分布最广泛、结构最复杂的一类次生化合物。生物体内的萜类化合物主要有两种生物合成途径：甲羟戊酸途径（mevalonate pathway，MVA）和 2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径（2-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway MEP）。研究表明，MEP 途径广泛存在于大多数致病菌、藻类、地衣及高等植物等，但目前尚未在人体和动物中发现该途径，因此该途径的关键酶已成为潜在抗菌素、抗疟药物和除草剂的靶点。1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸还原异构酶（DXR）是该途径中第一个限速酶，本实验克隆和表达创伤弧菌 DXR 蛋白并优化其酶活测定方法，在此基础上建立弧菌 DXR 抑制剂高通量筛选模型，并对利用刃天青筛选出的有抗菌活性的 20 个次级馏分进行 DXR 酶活性研究，获得 2 个阳性馏分，在进一步的深入研究中有望于从这些馏分中找到 DXR 酶的有效抑制剂，同时揭示其抗微生物的可能分子机制。两种方法为新型抗菌药物或先导化合物发现提供了依据。

关键词：海洋真菌；高通量筛选；刃天青；DXR

## ABSTRACT

Vibriosis is one of the major diseases in shrimp aquaculture, causing devastating mortality in the farm as well as in hatchery stage. The inappropriate use of antibiotics in aquaculture is one of the causes for the high incidence of antimicrobial resistant bacteria. It's necessary to screen new microbial natural extracts for antibacterial activity, but the testing methods present many challenges, standard broth microdilution is more suitable for pure compounds. In this work, we developed and validated a low cost, convenient, reliable, simple colorimetric microtiter assay using the resazurin viability dye. The parameters of the resazurin method for high-throughput screening (HTS) using microbial natural extracts against *vibrios* were optimized and set up. An HTS of microbial extracts of cultivated marine fungal was carried out against three pathogenic strains *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio Vulnificus* and *Vibrio campbellii*, and 2.2% of the extracts displayed antibacterial activity. According to the screening results and related literatures, we selected *Engyodontium album*, *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus flavus* to be fermented again. The secondary extracts of the fungi were purified by organic solvent extraction, column chromatography, reverse phase chromatography combined with TLC, HPLC. We used resazurin screening method for active tracking, separating a new compound EngyodontiuminA from the products of *Engyodontium album*.

1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) is involved in the synthesis of isoprenoids by the methylerythritol phosphate pathway (MEP). DXR is essential in *vibrios*, absent in human beings and animals which use only MVA pathway. Therefore, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) is the rate-limiting enzyme of MEP pathway and can be employed as ideal targets to screen antibiotics.

We established a reaction system which was used for quickly detecting DXR activity. We obtained 2 potential inhibitory activity extracts on DXR from 20 extracts

which inhibit vibrios. However, the compounds which inhibit the activity of DXR need further separating and detecting, laying the foundation for the discovering the new antibacterial drug or lead compounds.

Key Words: Marine Fungi; High Throughput Screening; Resazurin; 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate Reductoisomerase.

厦门大学博硕士论文摘要库

## 缩略语一览表

缩略语名	英文全名	中文名
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
bp	base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核苷酸
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate sodium salt	1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
HTS	High throughput screening	高通量筛选
kDa	kilo Dalton	千道尔顿
LB	Luria-bertain medium	LB 培养基
MBC	Minimum Bactericidal Concentration	最低杀菌浓度
MEP	non-mevalonate pathway	2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸
MHA	Mueller Hinton Agar medium	MH 琼脂培养基
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	最低抑菌浓度
MVA	Mevalonate	甲羟戊酸
NADPH	triphosphopyridine nucleotide	还原型辅酶 II
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
OD	optical density	光密度
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	polymerase chain reaction	链式聚合酶反应

PDA	Potato Dextrose Agar medium	马铃薯葡萄糖琼脂培养基
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
IC <sub>50</sub>	the half maximal inhibitory concentration	半抑制浓度
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷

## 第一部分 前言

### 1 弧菌病危害及流行特征

我国水产养殖业发展具有很长的历史,按养殖区域的不同分为海水养殖和淡水养殖。公元前 11 世纪,我国就有了淡水养殖,公元前 5 世纪时就有《养鱼经》的问世。我国改革开放 30 多年里,我国水产养殖业取得迅猛发展,中国的水产养殖产量占据了世界水产养殖总量的 71%。然而,随着水产养殖规模的不断扩大、集约化程度的不断提高,管理和技术的发展却相对落后,水域环境的恶化、水质污染严重、水产动物病害频发等问题的出现使我国的水产养殖业遇到了持续发展的“瓶颈”。如对虾的白斑综合症病毒,发病率最高的省份达到了 62.6%,一般死亡率在 30%左右<sup>[1]</sup>。从现有资料可知,我国养殖贝类因微生物类疾病导致死亡而造成的经济损失每年达到了 20~30 亿元<sup>[2]</sup>。目前我国人工养殖的鱼、虾、贝、藻等水产动植物的主要病害已经超过 200 种<sup>[3]</sup>,病原包括细菌、病毒、寄生虫等。

弧菌是海水养殖动物的主要病原菌之一,广泛分布于近海、河口海水及海洋生物体表及肠道中,其致病性主要受宿主生理状态及水质条件等综合因素影响,是一类条件致病菌。由弧菌引起的疾病,流行性广,发病率高,死亡率大,每年给我国养殖业造成了巨大损失。人们为了防治细菌性病害,大量抗生素被盲目、不科学地应用于水产养殖的各个阶段。抗生素的滥用不仅危害了水生动物的生长、污染了水域环境,还造成了耐药菌株不断出现,传统药物的治疗效果越来越差。因此,人们不断在寻找新的、安全的抗菌药物。

#### 1.1 弧菌病及感染传播途径

弧菌病的威胁是世界性的,其宿主的范围很广,包括养殖的和野生的水生动物。据报道,目前已确认的 30 多种弧菌中,有一半以上对虾、贝类和海水鱼类等水产动物具有致病性<sup>[4]</sup>。海水网箱养殖的太平洋鲑、非鲑鱼类(包括鳗鲡、海鲈和真鲷)和大西洋鲑、虹鳟均感染过弧菌病,因而其养殖业遭受严重损失。鄢庆枇等对海水网箱养殖大黄鱼病原菌进行了研究,发现溶藻弧菌是其致病菌,并



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库